

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101434656 B

(45) 授权公告日 2011.12.14

(21) 申请号 200710187932.1

(22) 申请日 2007.11.16

(73) 专利权人 首都医科大学

地址 100069 北京市丰台区右安门外西头条
10号首都医科大学

(72) 发明人 王炜 赵文明 马静 李慎涛

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 张庆敏

志》. 2001, 第 15 卷 (第 3 期),

马静等. 人骨保护素 - 分枝杆菌热休克蛋白
70 融合蛋白的克隆与表达及其活性鉴定. 《中国
组织工程研究与临床康复》. 2008, 第 12 卷 (第 15
期),

xu yong et al. High-bone-turnover
Osteoporosis and Aortic Calcification in
Opg Knockout Mice. 《生物化学与生物物理进
展》. 2007,

审查员 徐俊

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1318105 A, 2001.10.17,

李松等. 体外 rh IL - 1 β 诱导髌状突软骨
细胞 HSP70 的表达及其意义. 《现代口腔医学杂

权利要求书 1 页 说明书 14 页 附图 4 页

(54) 发明名称

OPG-HSP70 融合蛋白的制备方法及其用途

(57) 摘要

本发明为“OPG-HSP70 融合蛋白的制备方法
及用途”,属生物医药新技术领域。本发明提供
了一种骨保护素 - 热休克蛋白 70 (OPG-HSP70) 融
合蛋白药物。该药物针对类风湿性关节炎 (RA) 最
重要的病理学特征关节滑膜炎伴有软骨和骨的破
坏,通过骨保护素 (OPG) 作为诱饵受体,可与成
骨细胞等细胞表达的核因子 κ B 受体活化因子配
体 (RANKL) 结合,阻断 RANKL 与破骨细胞表达的
RANK 结合,从而抑制破骨细胞参与的骨吸收;利
用热休克蛋白 (HSP) 的保护性多肽片段抑制关节
炎症。发明包括编码该融合蛋白的 DNA 序列;经重
组技术产生这种融合蛋白的方法;以及该融合蛋
白的生物学活性等。

1. 一种产生 OPG-HSP70 融合蛋白的方法,其特征在于,该方法包括:

(a) 将编码 OPG 蛋白的核苷酸序列、L 接头蛋白的核苷酸序列和编码 HSP 蛋白的核苷酸序列可操作地连接于表达载体,得到 OPG-HSP70 融合蛋白重组表达载体;

(b) 将步骤 (a) 中的重组表达载体转化入大肠杆菌,筛选获得表达 OPG-HSP70 融合蛋白的工程菌;

(c) 在合适的条件下发酵培养诱导表达融合蛋白;

(d) 从步骤 (c) 中的培养产物中纯化分离所述融合蛋白;其中所述融合蛋白的形式为 R1-L-R2 形式,其中 R1 为 OPG 蛋白,R2 为 HSP 蛋白,L 为接头蛋白;

所述 OPG 蛋白为 SEQID No :1 所示的第 22-194 位氨基酸所组成的多肽;

所述的 HSP70 蛋白的氨基酸序列为 ITDAVITTPAYFNDA;

所述 L 接头选自:

(1) ala-(ala) n -ala, n 是 1 ~ 4 间的整数;

(2) gly-(gly) n -gly, n 是 1 ~ 4 间的整数;

(3) gly-pro-gly;

(4) gly-gly-pro-gly-gly;

(5) ser-gly-(gly) n -gly, n 是 1 ~ 4 间的整数;

(6) val;

(7) tyr-val;

(8) 亚部分 (1)-(7) 的任何组合。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤 (c) 包括重组克隆质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞,挑选单菌落接种于 5mL 含 25mg/L 卡那霉素的 2×YT 培养基,37℃ 振荡过夜;次日 1 : 50 转接后,37℃ 培养 2h,加入 IPTG 使之终浓度为 0.1mmol/L,30℃ 继续振荡培养 5h 后离心收集菌体。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤 (d) 包括采用包涵体的溶解,稀释复性及分子筛层析获得目的蛋白。

4. 权利要求 1-3 任一项所述方法产生的融合蛋白在制备用于治疗类风湿关节炎的药物中的应用。

OPG-HSP70 融合蛋白的制备方法及其用途

[0001]

技术领域

[0002] 本发明涉及使用大肠杆菌表达制备重组骨保护素-热休克蛋白 70 (OPG-HSP70) 融合蛋白的方法,含有由该方法制备的重组骨保护素-热休克蛋白 70 (OPG-HSP70) 的药物制剂以及该药物制剂在制备预防或治疗类风湿关节炎中的药物中的用途。

[0003]

技术背景

[0004] 类风湿性关节炎 (Rheumatoid arthritis, RA) 是一种 T 细胞介导的,以滑膜炎为主要特征,同时伴有关节软骨及骨损伤的自身免疫性疾病。RA 在中国的患病率为 0.32%~0.38%,且致残率高,RA 给劳动力、社会经济造成的损失是巨大的。而 RA 又是一种难治性疾病,虽然现有治疗手段多种多样,但都不甚理想。本发明针对 RA 发病中骨损伤及慢性炎症反应这两个相关联的 RA 的关键性病理学问题,研制 OPG-HSP70 融合蛋白,为 RA 的治疗开辟了一种新的思路。

[0005] 近几年,对于破骨细胞 (osteoclast, OC) 的研究不仅引发了免疫调节、骨代谢疾病中的理论研究,也为临床诊断和治疗骨代谢性疾病提供了新的依据。对 OC 从细胞生物学和分子生物学方面等进行的研究,开辟了各种骨相关疾病的药物研发的新领域 (N Engl J Med. 2005, 353(9):872-75)。由于 OC 是形成侵蚀性关节炎的必要成分,因此其可以作为 RA 治疗的一个靶点。

[0006] OC 的分化和 / 或功能变化所导致的骨重建失衡是多种代谢性骨病,如骨质疏松症、骨质硬化症和畸形性骨炎 (Paget 骨病) 等形成的病理基础。目前已经证明多种激素和局部细胞因子如活性维生素 D3、糖皮质激素、甲状旁腺素 (PTH)、前列腺素 (PGE2)、IL-6、IL-11、IL-12 等不仅能调节 OC 生成,还能调节 OC 的功能。这些因子主要作用于成骨 / 基质细胞,通过调节骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) 和 NF- κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL) 的表达,调控 OPG、RANKL 和 NF- κ B 受体活化因子 (receptor activator of NF- κ B, RANK) 之间的比例,介导 OC 生成并维持其功能。因此 OPG、RANKL 及 RANK 是 OC 的最终调节因子。3 种分子在 OC 分化成熟过程中的相互关系及作用机理的阐明,为多种代谢性骨病的防治提供了理论依据 (Curr Opin Rheumatol. 2003, 15(3):280-7)。

[0007] 1997 年 OPG 被发现,它属于肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 超家族成员,有单体和由二硫键连接的同源二聚体两种形式,分子量分别为 60 kD 和 120 kD。单体存在于成骨细胞内,而二聚体可分泌入基质中,是一种分泌型糖蛋白。OPG 在进化中高度保守,大鼠和小鼠 OPG 的同源性为 94%,小鼠和人 OPG 的同源性为 89%。OPG 最初含 401 个氨基酸残基,在合成过程中因去除 21 个氨基酸残基组成的信号肽,最终成为含 380 个氨基酸的成熟蛋白质。其 N 端有 4 个富含半胱氨酸的功能域 (D1~D4) 与其配体结合,C 端与已知的蛋白没有同源性。许多组织器官可以表达 OPG mRNA,如肺、心脏、肾脏、肝、胃肠、脑、脊柱、甲状腺等,其主要作用是抑制骨吸收 (Cell. 1997, 89(2):309-19)。实验表明,去除 OPG 的 C 端部分 (至 194aa) 并不影响 OPG 活性,因此包括 TNFR 样功能区的 OPGN 端序列对于抑制 OC 分化成熟是必需的也是足够的。

[0008] 在发现 OPG 的一年后,美国的同一个研究小组又发现了 OPG 的配体 OPGL(Cell. 1998,93(2):165-76),即 RANKL,属 TNF 超家族成员,存在膜结合型和可溶性两种形式,主要由成骨细胞和骨髓基质细胞表达,可以促进 OC 分化、刺激其活化并提高 OC 存活率。这些作用出现于 RANKL 与其受体 RANK 结合时,并最终表现为对骨的吸收。RANK 表达于破骨细胞的前体细胞表面,与成骨/基质细胞表面的 RANKL 结合,可启动 OC 的分化和成熟。OPG 作为 RANK 的诱饵受体(decoy receptor),以竞争的方式,高亲和性地与 RANKL 特异性结合,阻止 RANKL 与 OC 上的 RANK 结合,负向调节 OC 的分化和活化并促进破骨细胞凋亡,从而抑制骨吸收,在骨代谢调节中起着关键性作用。实验研究表明,OPG 缺陷型小鼠出现严重的骨质疏松,并伴有低骨矿物密度和多发性骨折以及严重的动脉硬化,这是由于 RANKL 和 RANK 的结合增加,从而导致 OC 的形成所致。给正常小鼠重组 OPG 可以提高其胫骨和股骨的骨量,并可以补偿卵巢切除后由于雌激素丧失而引起的骨丢失。用 OPG 治疗青少年 Paget 骨病取得了良好的效果,且没有明显的副反应发生(N Engl J Med. 2005,353(9):918-23)。2005 年举行的美国内分泌学会(ENDO)年会上,报告了将重组的 OPG 应用于 40~70 岁妇女,可以降低人体对骨的再吸收。这些临床研究进一步说明了 OPG 在防止骨破坏方面具有良好的应用前景。

[0009] RA 的关节破坏包括滑膜表面、关节软骨和软骨下骨的侵蚀。近期研究发现 OC 是 RA 关节破坏的关键成份,在病灶部位有大量的成熟 OC 及 OC 前体,另外活性淋巴细胞、巨噬细胞、成骨细胞和其他细胞表达多种细胞因子,作用于 OC 生成、分化、活化等各个环节,使 OC 过度增殖或异常活跃,打破了骨代谢的平衡,骨的破坏占据优势。目前认为活化的 T 淋巴细胞表达的 RANKL 是 RA 中的关键调节因子,可为 RA 中免疫系统与骨代谢提供联系(Arthritis Rheum. 2006,54(6):1772-7)。RA 关节病变部位出现的大量活化的 T 淋巴细胞能够直接通过膜结合型的 RANKL 和可溶性 RANKL 启动破骨细胞的生成,使关节部位形成更多的 OC 前体和成熟 OC,并引起骨丢失。多种 T 细胞来源的细胞因子可能干扰 RANK 信号通路,从而影响 OC 的生成,如 IL-12、IL-18、IL-4 等。其中 IL-4 作为抗炎性细胞因子通过 STAT-6 依赖机制抑制 OC 的分化,最新研究表明 IL-4 通过抑制 NF- κ 3 和 Ca²⁺ 信号通路直接作用于 OC 而抑制骨的再吸收(J Immunol. 2005,175(2):917-25)。在佐剂型关节炎动物模型中,炎症活动部位可检测到 RANKL 的表达,且与 OC 的增加、活化相一致,从而导致严重骨与关节破坏。给予 OPG 可阻抑骨关节的破坏,但对免疫炎症反应无改善作用(Nature. 1999,402(6759):304-9)。在胶原诱导的关节炎(collagen-induced arthritis,CIA)模型中 OPG 亦能减少或阻止骨破坏,但对滑膜炎没有作用(Am J Pathol. 2002,161(4):1419-27)。由此表明,OPG 并不能解决 RA 的慢性炎症问题,炎症仍是相当棘手的问题。动物试验发现,T 细胞在 RA 炎症的发生发展中起着重要作用,近年来的研究提示,热休克蛋白(heat shockprotein,HSP)可通过调节 T 细胞功能抑制 RA 的炎症反应。

[0010] 热休克蛋白属于分子伴侣蛋白,不仅仅对细胞内一些蛋白质分子构象和稳定性起调节性作用,还对细胞应激、代谢、增殖以及凋亡等生理过程具有重要的调控作用。根据单体分子量的大小,热休克蛋白可分有 6 个家族:HSP10、HSP40、HSP60、HSP70、HSP90 和 HSP100。其中 HSP70 作为免疫显性抗原,在进化中高度保守,哺乳动物的 HSP 与微生物的 HSP 有很高的同源性,所以也很容易引起免疫交叉反应。随着对免疫调节机制特别是调节性 T 细胞的深入研究,HSP 的免疫调节作用也逐渐被人们所认识。HSP 诱导调节性 T 细胞的能力

是其他细菌保守抗原所不具备的,它可能与参与固有免疫应答细胞的某些 HSP 受体有关,而这些受体又是连接固有免疫应答和适应性免疫应答的桥梁。哺乳动物和细菌的 HSP 都可以直接活化 APC(巨噬细胞和树突状细胞),这种作用可能是通过结合到细胞表面受体如 CD14、CD40、TLRs、CD36、CD91 和 LOX1 等实现的(Tissue Antigens. 2004, 64(4):442-51)。

[0011] HSP70 作为免疫显性抗原,可以被机体识别并产生相应的免疫反应。分析 HSP70 的表位发现,只有那些能够诱导自身 HSP 交叉反应性 T 细胞的表位才有保护作用。由于 HSP70 进化保守区段在微生物与哺乳动物之间产生交叉反应,这些保守肽段产生的自身抗原交叉反应性 T 淋巴细胞又可分泌抑制炎症的细胞因子,如 IL-4、IL-10 和 TGF- β ,从而激活了免疫调节机制,直接抑制前炎症性效应 T 淋巴细胞,或者调节 APC,阻止炎症疾病的进程。而且, HSP 肽段的保护性作用与致病性作用无关。

[0012] 研究表明用结核杆菌 HSP70 肽段免疫动物有较好的防治 CIA 的效果,关节炎指数明显下降、病理变化较轻、抑制性细胞因子 IL-4 水平升高,而炎症细胞因子 IFN- γ 水平和抗 C II 抗体水平降低,与阳性对照组相比有显著性差异(中国免疫学杂志. 2006, 22(12): 1092-5)。

[0013] 鉴于滑膜炎和骨损伤是 RA 的两个最显著的病理学特征,我们将编码 OPG 及 HSP70 功能性片段的 DNA 片段连接(去除两者的与治疗 RA 无关的或对机体有害的肽段,并有利于制剂的制备),插入原核表达载体 pET28a。在此基础上,对重组蛋白进行原核表达,并通过分子筛或离子交换层析等方法对重组蛋白进行纯化,采用 SDS-PAGE、Western-blot 法等对融合蛋白进行理化鉴定。其次,通过体内外生物活性实验对融合蛋白做进一步分析。该体系蛋白表达量高,可控性强,生产成本相对较低,且具有良好的生物学活性,容易实现大规模生产。

[0014] 发明内容

[0015] 本发明的一个目的在于提供用大肠杆菌表达 OPG-HSP70 融合蛋白并分离纯化制备 OPG 融合蛋白的生产方法。

[0016] 本发明还提供一种 OPG-HSP70 融合蛋白,及其在制备用于预防和治疗类风湿关节炎的药物中的用途。

[0017] 本发明的另一个目的是提供含有本发明的 OPG-HSP70 融合蛋白和药学上可接受的载体的药物制剂。

[0018] 本发明所述的 OPG 融合蛋白指 OPG 或其活性变体、片段与 HSP 或其变体、片段融合而成的蛋白。

[0019] 本发明提供一种编码 OPG 与 HSP70 融合蛋白的核酸序列。但在某些实施方案中,可以根据实际需要,对核酸密码子进行突变,选用大肠杆菌偏好密码子,但编码 OPG-HSP70 融合蛋白的氨基酸序列不变。

[0020] 本发明所述的 OPG-HSP70 融合蛋白,其为 R1-L-R2 形式,其中 R1 为 OPG 蛋白、或其变体或片段, R2 为 HSP 蛋白、或其变体或片段, L 为接头蛋白。

[0021] 所述 OPG 蛋白,或其变体、片段选自:

[0022] (a) SEQIDNo. 1 所示的蛋白序列;

[0023] (b) 氨基酸序列 22-X,其中 X 为 SEQIDNo. 1 所示的包括位置 185-401 的任意氨基酸残基。

[0024] 所述的 HSP70 蛋白、或其变体或片段选自：

[0025] (a) SEQIDNo. 2 所示的氨基酸序列；

[0026] (b) 氨基酸序列 ITDAVITTPAYFNDA。

[0027] 所述接头选自：

[0028] (a) ala-(ala) n -ala, n 可以是 1 ~ 4 间的整数；

[0029] (b) gly-(gly) n -gly, n 可以是 1 ~ 4 间的整数；

[0030] (c) gly-pro-gly；

[0031] (d) gly-gly-pro-gly-gly；

[0032] (e) ser-gly-(gly) n -gly, n 可以是 1 ~ 4 间的整数；

[0033] (f) val；

[0034] (g) tyr-val；

[0035] (h) 亚部分 (a)-(g) 的任何组合。

[0036] 本发明中所指的大肠杆菌包括大肠杆菌 BL21 (DE3) 等宿主细胞。本发明所使用的表达载体可以选用各种已知的原核表达载体,将重组表达载体转化至宿主细胞,利用合适的条件筛选重组子,诱导表达 OPG-HSP70 融合蛋白。

[0037] 在本发明的一个优选的实施例中,在合适的条件下发酵培养工程菌的步骤包括：

[0038] 将酶切鉴定正确的重组克隆质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞,挑选单菌落接种于 5mL 2×YT 培养基 (含 25mg/L 卡那霉素),37℃ 振荡过夜。次日 1 : 50 转接后,37℃ 培养 2h,加入 IPTG 使之终浓度为 0.1mmol/L,30℃ 继续振荡培养 5h 后离心收集菌体。

[0039] 在本发明的一个优选的实施例中,从发酵产物中纯化分离并复性出 OPG-HSP70 融合蛋白包括以下要点：

[0040] 阳性克隆菌株于 0.1mmol/L IPTG,30℃ 诱导培养 5h 后,4℃,6000r/min 离心 15min,收集菌体,用预冷的 20mM Tris-HCL (pH = 7.9) 缓冲液洗涤菌体,按每克湿菌体加 10 倍体积的 Buffer A [1M Tris-HCl (pH8.0),5M NaCl,0.5M EDTA (pH8.0),0.5% Triton100,1M DTT] 重悬,加入溶菌酶至 1mg/ml,同时加入 PMSF 至 1mM,冰上放置 30min 后,间歇超声破碎菌体 10min,离心收集包涵体沉淀,再分别用 2M 尿素包涵体洗涤液和 BufferA 各洗两次,然后用 8M 尿素变性液溶解包涵体,4℃,12000r/min 离心 45min,取上清。上清再经 0.22 μ m 的微孔滤膜过滤,即为含有目的重组蛋白的变性液。将大量表达的重组蛋白变性液通过超滤浓缩的方法浓缩为 6mg/mL。按尿素浓度逐步递减 (4M-3M-2M-1M-0.5M-0M) 的方法配好复性液 (4M 尿素,1mM 还原型谷胱甘肽,0.1mM 氧化型谷胱甘肽,20% 甘油,5% 葡萄糖, PBS, pH7.2),将浓缩的蛋白变性液 5mL 置于透析袋内,透析袋置于大体积的复性液中 4℃ 缓慢搅拌透析。根据透析过程中蛋白是否析出以及析出量的多少确定最佳透析条件,约四个小时更换一次尿素浓度逐渐降低的透析液,对蛋白变性液进行稀释复性。复性后的蛋白最后溶解于 pH7.2 的 PBS 溶液中。

[0041] 已确证, OPG-Fc 融合蛋白在临床应用上是安全有效的,因此, OPG-HSP70 融合蛋白可用于药物使用。

[0042] OPG-HSP70 融合蛋白可以用于预防和治疗类风湿关节炎等疾病,抑制骨破坏作用并发挥抑制炎症作用。

[0043]

附图说明

[0044] 图 1 显示本发明重组质粒的构建示意图

[0045] 图 2 显示本发明表达载体的示意图

[0046] 图 3OPG/OPG-HSP70PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图谱

[0047] 图 4OPG-HSP70 融合蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱

[0048] 图 5OPG-HSP70 包涵体洗涤过程的 SDS-PAGE 电泳图谱

[0049] 图 6Western-blotting 分析 OPG-HSP70 融合蛋白

[0050] 图 7 复性后 OPG-HSP70 融合蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱

[0051] 图 8OPG-HSP70 融合蛋白对破骨细胞的分化抑制

[0052] 图 9OPG-HSP70 融合蛋白对炎性细胞因子产生的抑制作用

[0053] 图 10OPG-HSP70 融合蛋白对炎症模型小鼠的抑炎作用

[0054] 具体实施方式

[0055] 实施例 1OPG 全长基因的克隆

[0056] 根据文献报道的人 OPG 编码区 cDNA 的序列 (GenBank 号 NM_002546), 设计 2 条针对 OPG 编码区 cDNA 的寡核苷酸引物, 人骨肉瘤细胞系 MG63 培养至对数生长早期, 加入 rhBMP-2 (在培养基中终浓度达 100ug/L), 继续培养至对数生长期后, 细胞计数, 离心收集细胞。按照 Trizol Reagent 总 RNA 提取试剂说明书提取细胞总 RNA。根据 MMLV 第一链 cDNA 合成试剂盒说明书操作步骤, 以寡聚 (dT) 为引物合成 cDNA 第一链。取 8uL 逆转录产物为模板, 在 TaqDNA 聚合酶作用下, 分别用 P1, P2 引物进行 PCR, 反应条件为 :95℃变性 5min 后, 按下述参数循环 35 次 :94℃变性 45s, 52℃退火 30s, 68℃延伸 1min。纯化后的 PCR 产物与质粒 pGEM-T-Easy 在 T4DNA 连接酶的作用下, 4℃连接过夜, 连接产物转化 E. coli DH5a 感受态细胞, 挑选单菌落接种于 5ml LB 培养基 (含 100mg/L 氨苄青霉素) 的试管中, 37℃振荡过夜, 收集菌体, 碱裂解法小量提取质粒, 经 EcoRI 酶切鉴定, 构建重组质粒 pGEM-T-Easy-OPG。取酶切鉴定正确的重组克隆进行序列测定。

[0057] 实施例 2OPG-HSP70 融合蛋白原核表达载体的构建

[0058] 以测序正确的重组质粒 pGEMT-Easy-OPG 为模板, P3 和 P4 为引物进行第一次 PCR 扩增, 然后以此次的 PCR 产物为模板, P3 和 P5 为引物进行第二次 PCR 扩增, 得到 OPG-HSP70 融合基因。PCR 产物经纯化后与原核表达载体 pET-28a 同时利用 Nco I 和 Xho I 限制性内切酶进行双酶切反应。酶切后的载体和目的 DNA 经纯化、连接后, 转化 E. Coli DH5a 感受态细胞中, 挑选单菌落接种于 5mL LB 培养基 (含 25mg/L 卡那霉素) 的锥形瓶中, 37℃振荡过夜。收集菌体, 小量提取质粒, 再经 Nco I 和 Xho I 双酶切鉴定。取酶切鉴定正确的重组克隆进行序列测定。

[0059] 实施例 3 OPG-HSP70 融合蛋白在大肠杆菌中的诱导表达

[0060] 将酶切鉴定正确的重组克隆质粒转化大肠杆菌 E. coli BL21 (DE3) 感受态细胞, 挑选单菌落接种于 5mL 2×YT 培养基 (含 25mg/L 卡那霉素), 37℃振荡过夜。次日 1 : 50 转接后, 37℃培养 2h, 加入 IPTG 使之终浓度为 0. 1mmol/L, 30℃继续振荡培养 5h 后离心收集菌体。

[0061] 实施例 4 OPG-HSP70 融合蛋白在大肠杆菌中的纯化与复性

[0062] 阳性克隆菌株于 0. 1mmol/L IPTG, 30℃诱导培养 5h 后, 4℃, 6000r/min 离心 15min, 收集菌体, 用预冷的 20mM Tris-HCL (pH = 7. 9) 缓冲液洗涤菌体, 按每克湿菌体加 10

倍体积的 Buffer A[1M Tris-HCl (pH8.0), 5M NaCl, 0.5M EDTA (pH8.0), 0.5% Triton100, 1MDTT] 重悬, 加入溶菌酶至 1mg/ml, 同时加入 PMSF 至 1mM, 冰上放置 30min 后, 间歇超声破碎菌体 10min, 离心收集包涵体沉淀, 再分别用 2M 尿素包涵体洗涤液和 BufferA 各洗两次, 然后用 8M 尿素变性液溶解包涵体, 4℃, 12000r/min 离心 45min, 取上清。上清再经 0.22um 的微孔滤膜过滤, 即为含有目的重组蛋白的变性液。将大量表达的重组蛋白变性液通过超滤浓缩的方法浓缩为 6mg/mL。按尿素浓度逐步递减 (4M-3M-2M-1M-0.5M-0M) 的方法配好复性液 (4M 尿素, 1mM 还原型谷胱甘肽, 0.1mM 氧化型谷胱甘肽, 20% 甘油, 5% 葡萄糖, PBS, pH7.2), 将浓缩的蛋白变性液 5mL 置于透析袋内, 透析袋置于大体积的复性液中 4℃ 缓慢搅拌透析。根据透析过程中蛋白是否析出以及析出量的多少确定最佳透析条件, 约四个小时更换一次尿素浓度逐渐降低的透析液, 对蛋白变性液进行稀释复性。复性后的蛋白最后溶解于 pH7.2 的 PBS 溶液中。

[0063] 实施例 5 活性实验 :OPG-HSP70 融合蛋白对破骨细胞的分化抑制

[0064] 将冻存的原代小鼠骨髓细胞复苏后, 37℃、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养。然后加入巨噬细胞集落刺激因子 M-CSF 至终浓度为 25ng/mL, 于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养 24h。次日收集细胞悬液, 即为 M-CSF 依赖性非附着性骨髓单核细胞。1000r/min, 常温离心 5min, 弃上清, PBS 洗两遍。用 1640 培养基 (含 25ng/mL 的 M-CSF 和 40ng/mL 的 RANKL) 重悬细胞, 计数, 并调整细胞浓度为 1×10^6 /mL。24 孔板中每个孔分别放置一张玻片, 各孔分别加入培养液 1640 200 μ L, 37℃ 温育 2h 后吸出培养液。按照加入 OPG-HSP70 融合蛋白或 PBS 的不同分为实验组和对照组, 每组 10 个复孔。实验组加入 OPG-HSP70 融合蛋白至终浓度为 10 μ g/mL, 对照组加入同样的 PBS 液。然后每个孔中分别各加入 M-CSF 和 RANKL 重悬的骨髓细胞悬液 1mL, 37℃、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养。三天后第一次换液, 此后每两天换液一次, 每次换液 50%, 培养至第七天时, 弃去培养基, PBS 洗细胞两次, 4% (体积分数) 甲醛溶液固定 15min, 然后再用 PBS 洗细胞两次, 空气中自然干燥。按照 Sigma 说明书行 TRAP 染色, 于光学显微镜下计数多个核 TRAP 阳性破骨细胞。2 个以上细胞核、染为红色的为破骨细胞。

[0065] 实施例 6 活性实验 :OPG-HSP70 融合蛋白对炎症模型小鼠的抑炎作用

[0066] 小鼠腹部皮肤脱毛, 范围约 3cm \times 3cm, 用 1% 二硝基氟苯 (DNFB) 溶液 40 μ L 均匀涂抹致敏。固定小鼠 5sec, 使皮肤表面溶剂挥发。同时给予实验组小鼠腹腔注射 OPG-HSP70 融合蛋白, 0.2mg/只/次; 对照组同时腹腔注射生理盐水。隔日注射, 共注射三次。次日再涂抹 DNFB 致敏强化一次。致敏后第 5 天, 用 1% DNFB 溶液 10 μ L 均匀涂抹于小鼠右耳 (两面) 进行攻击。24 h 后, 断颈处死小鼠, 用游标卡尺测量左右耳厚度之差为肿胀度。采用单因素方差分析比较各实验组与对照组的差异。左右耳厚度之差表示 DTH 的程度。

[0067] 于小鼠发病高峰, 即攻击后 24h, 断颈处死小鼠, 在装满酒精的大烧杯里浸泡 2min 左右, 然后将小鼠转移到超净工作台内。取一无菌培养皿, 在其内加入 8mL 的 1640 细胞培养液, 将 200 目细胞筛浸入其中, 将分离的脾脏放于细胞筛上, 用注射器芯均匀研磨脾脏到没有肉眼可见的组织碎块。用尖吸管吸取细胞筛下的 8mL 脾细胞悬液到无菌 15mL 离心管内, 轻轻吹打混匀。用尖吸管吸取脾细胞悬液滴加到已盛有 4mL 淋巴细胞分离液的 15mL 离心管内, 使脾细胞悬液重叠于分离液面。水平离心机 2000rpm 离心 20min。离心后绝大多数单个核细胞悬浮于血浆与分离液界面, 呈白膜状。将尖吸管轻插至白膜层, 沿试管壁边缘吸出

单个核细胞,移入另一无菌 15mL 离心管中。加入 5mL 1640 细胞培养液,充分混匀,1500rpm 离心 15min 后弃上清,将沉淀细胞再次重悬于 5mL 1640 细胞培养液中,1500rpm 离心 15min 后弃上清,吸净残液,然后于管中加入不含细胞刺激剂的完全培养基 50 μ L,吹打混匀后将其转移到 1.5mL 离心管中。取出上述原液 4 μ L 到已盛有 400 μ L 生理盐水的离心管中(即将细胞原液稀释 100 倍),充分混匀后取 10 μ L,从侧面加入已盖好盖玻片的计数板上,取四个角 4 个大格进行计数。计数完毕后,计算细胞原液的浓度,公式为细胞原液浓度 = 4 个大格的细胞总数 / $4 \times 10^4 \times$ 稀释倍数 (100),用含有细胞刺激剂的完全培养基稀释,使细胞的终浓度为 3×10^6 /mL。

[0068] 取 PVDF 膜包被的 96 孔板 (MAIPAN4510 板),用来检测 IFN- γ 。待检物共分实验组和对照组 2 个组别。双孔检测,最后取平均值。每孔加 100 μ L 70%乙醇预湿 PVDF 膜,盖上板盖,室温孵育 5min。然后吸出或弹出孔内乙醇,立即用 PBS 溶液洗两遍,在吸水纸上拍干。每孔加入 50 μ L 用 5mL PBS 稀释的包被抗体,添加无菌 PBS 至 100 μ L,盖上板盖,4 $^{\circ}$ C 包被过夜。弃去孔中液体,用洗涤缓冲液 PBST 洗涤,静置 15 ~ 30s 后甩出液体,重复洗涤 5 次,在无菌吸水纸上拍干板子。然后每孔加入 200 μ L 的 1 \times 封闭液 R(用 PBS 溶液稀释 10 倍),盖上板盖,37 $^{\circ}$ C 孵育 1h(或室温孵育 2h)。弃去孔中封闭液,每孔加 100 μ L 细胞悬液(细胞浓度为 3×10^6 /mL,并且含有细胞刺激剂),盖上板盖,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、100%湿度的环境下孵育 20 ~ 24h。甩出反应孔中的细胞,迅速在每孔加入室温下的 PBS 溶液 250 μ L,然后用力甩出,重复 3 次后,用 PBST 洗涤 5 次。然后每孔加入 100 μ L 生物素化检测抗体稀释液,用封板膜封好反应板,于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。弃去孔中液体,用 PBST 冲洗膜的两侧 5 次。然后每孔加入 100 μ L 链霉素 -HRP 亲和素稀释液,用封板膜封好反应板,于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。弃去孔中液体,用 PBST 冲洗膜的两侧 5 次。然后每孔立即加入 100 μ L 解冻的 AEC 底物液,盖上板盖,室温避光反应 15 ~ 30min;当清晰的斑点形成后,弃去孔中液体并用 DDW 充分冲洗膜的两侧以终止反应。室温下干燥 PVDF 板,用免疫斑点图像分析仪计数。统计学处理 Eli-spot 结果: 采用 SPSS 统计软件 12.0 中的单因素方差分析法进行各组之间的数据分析。

[0069] 序列表

[0070] <110> 王炜 赵文明 马静 李慎涛

[0071] <120>OPG-HSP70 融合蛋白的制备方法及应用

[0072] <160>9

[0073] <170>PatentIn version 3.3

[0074] <210>1

[0075] <211>401

[0076] <212>PRT

[0077] <213>Artificial

[0078] <220>

[0079] <223>OPG 蛋白

[0080] <220>

[0081] <221>MISC_FEATURE

[0082] <222>(1)..(401)

[0083] <400>1

[0084] Met Asn Lys Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser Ile
 [0085] 1 5 10 15
 [0086] Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp
 [0087] 20 25 30
 [0088] Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr
 [0089] 35 40 45
 [0090] Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro
 [0091] 50 55 60
 [0092] Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys
 [0093] 65 70 75 80
 [0094] Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu
 [0095] 85 90 95
 [0096] Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr
 [0097] 100 105 110
 [0098] Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe
 [0099] 115 120 125
 [0100] Gly Val Val Gln Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg
 [0101] 130 135 140
 [0102] Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys
 [0103] 145 150 155 160
 [0104] Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys
 [0105] 165 170 175
 [0106] Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr
 [0107] 180 185 190
 [0108] Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg
 [0109] 195 200 205
 [0110] Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val
 [0111] 210 215 220
 [0112] Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile
 [0113] 225 230 235 240
 [0114] Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu
 [0115] 245 250 255
 [0116] Trp Lys His Gln Asn Lys Ala Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln
 [0117] 260 265 270
 [0118] Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala
 [0119] 275 280 285
 [0120] Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly
 [0121] 290 295 300
 [0122] Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys

[0123] 305 310 315 320
 [0124] Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn
 [0125] 325 330 335
 [0126] Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser
 [0127] 340 345 350
 [0128] Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr
 [0129] 355 360 365
 [0130] Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu
 [0131] 370 375 380
 [0132] Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys
 [0133] 385 390 395 400
 [0134] Leu
 [0135] <210>2
 [0136] <211>625
 [0137] <212>PRT
 [0138] <213>Artificial
 [0139] <220>
 [0140] <223>HSP 蛋白
 [0141] <220>
 [0142] <221>MISC_FEATURE
 [0143] <222>(1).. (625)
 [0144] <400>2
 [0145] Met Ala Arg Ala Val Gly Ile Asp Leu Gly Thr Thr Asn Ser Val Val
 [0146] 1 5 10 15
 [0147] Ser Val Leu Glu Gly Gly Asp Pro Val Val Val Ala Asn Ser Glu Gly
 [0148] 20 25 30
 [0149] Ser Arg Thr Thr Pro Ser Ile Val Ala Phe Ala Arg Asn Gly Glu Val
 [0150] 35 40 45
 [0151] Leu Val Gly Gln Pro Ala Lys Asn Gln Ala Val Thr Asn Val Asp Arg
 [0152] 50 55 60
 [0153] Thr Val Arg Ser Val Lys Arg His Met Gly Ser Asp Trp Ser Ile Glu
 [0154] 65 70 75 80
 [0155] Ile Asp Gly Lys Lys Tyr Thr Ala Pro Glu Ile Ser Ala Arg Ile Leu
 [0156] 85 90 95
 [0157] Met Lys Leu Lys Arg Asp Ala Glu Ala Tyr Leu Gly Glu Asp Ile Thr
 [0158] 100 105 110
 [0159] Asp Ala Val Ile Thr Thr Pro Ala Tyr Phe Asn Asp Ala Gln Arg Gln
 [0160] 115 120 125
 [0161] Ala Thr Lys Asp Ala Gly Gln Ile Ala Gly Leu Asn Val Leu Arg Ile

[0162]	130	135	140
[0163]	Val Asn Glu Pro Thr Ala Ala Ala Leu Ala Tyr Gly Leu Asp Lys Gly		
[0164]	145	150	155
[0165]	Glu Lys Glu Gln Arg Ile Leu Val Phe Asp Leu Gly Gly Gly Thr Phe		
[0166]		165	170
[0167]	Asp Val Ser Leu Leu Glu Ile Gly Glu Gly Val Val Glu Val Arg Ala		
[0168]		180	185
[0169]	Thr Ser Gly Asp Asn His Leu Gly Gly Asp Asp Trp Asp Gln Arg Val		
[0170]		195	200
[0171]	Val Asp Trp Leu Val Asp Lys Phe Lys Gly Thr Ser Gly Ile Asp Leu		
[0172]		210	215
[0173]	Thr Lys Asp Lys Met Ala Met Gln Arg Leu Arg Glu Ala Ala Glu Lys		
[0174]		225	230
[0175]	Ala Lys Ile Glu Leu Ser Ser Ser Gln Ser Thr Ser Ile Asn Leu Pro		
[0176]		245	250
[0177]	Tyr Ile Thr Val Asp Ala Asp Lys Asn Pro Leu Phe Leu Asp Glu Gln		
[0178]		260	265
[0179]	Leu Thr Arg Ala Glu Phe Gln Arg Ile Thr Gln Asp Leu Leu Asp Arg		
[0180]		275	280
[0181]	Thr Arg Lys Pro Phe Gln Ser Val Ile Ala Asp Thr Gly Ile Ser Val		
[0182]		290	295
[0183]	Ser Glu Ile Asp His Val Val Leu Val Gly Gly Ser Thr Arg Met Pro		
[0184]		305	310
[0185]	Ala Val Thr Asp Leu Val Lys Glu Leu Thr Gly Gly Lys Glu Pro Asn		
[0186]		325	330
[0187]	Lys Gly Val Asn Pro Asp Glu Val Val Ala Val Gly Ala Ala Leu Gln		
[0188]		340	345
[0189]	Ala Gly Val Leu Lys Gly Glu Val Lys Asp Val Leu Leu Leu Asp Val		
[0190]		355	360
[0191]	Thr Pro Leu Ser Leu Gly Ile Glu Thr Lys Gly Gly Val Met Thr Arg		
[0192]		370	375
[0193]	Leu Ile Glu Arg Asn Thr Thr Ile Pro Thr Lys Arg Ser Glu Thr Phe		
[0194]		385	390
[0195]	Thr Thr Ala Asp Asp Asn Gln Pro Ser Val Gln Ile Gln Val Tyr Gln		
[0196]		405	410
[0197]	Gly Glu Arg Glu Ile Ala Ala His Asn Lys Leu Leu Gly Ser Phe Glu		
[0198]		420	425
[0199]	Leu Thr Gly Ile Pro Pro Ala Pro Arg Gly Ile Pro Gln Ile Glu Val		
[0200]		435	440
			445

[0201]	Thr Phe Asp Ile Asp Ala Asn Gly Ile Val His Val Thr Ala Lys Asp	
[0202]	450	455 460
[0203]	Lys Gly Thr Gly Lys Glu Asn Thr Ile Arg Ile Gln Glu Gly Ser Gly	
[0204]	465	470 475 480
[0205]	Leu Ser Lys Glu Asp Ile Asp Arg Met Ile Lys Asp Ala Glu Ala His	
[0206]	485	490 495
[0207]	Ala Glu Glu Asp Arg Lys Arg Arg Glu Glu Ala Asp Val Arg Asn Gln	
[0208]	500	505 510
[0209]	Ala Glu Thr Leu Val Tyr Gln Thr Glu Lys Phe Val Lys Glu Gln Arg	
[0210]	515	520 525
[0211]	Glu Ala Glu Gly Gly Ser Lys Val Pro Glu Asp Thr Leu Asn Lys Val	
[0212]	530	535 540
[0213]	Asp Ala Ala Val Ala Glu Ala Lys Ala Ala Leu Gly Gly Ser Asp Ile	
[0214]	545	550 555 560
[0215]	Ser Ala Ile Lys Ser Ala Met Glu Lys Leu Gly Gln Glu Ser Gln Ala	
[0216]	565	570 575
[0217]	Leu Gly Gln Ala Ile Tyr Glu Ala Ala Gln Ala Ala Ser Gln Ala Thr	
[0218]	580	585 590
[0219]	Gly Ala Ala His Pro Gly Gly Glu Pro Gly Gly Ala His Pro Gly Ser	
[0220]	595	600 605
[0221]	Ala Asp Asp Val Val Asp Ala Glu Val Val Asp Asp Gly Arg Glu Ala	
[0222]	610	615 620
[0223]	Lys	
[0224]	625	
[0225]	<210>3	
[0226]	<211>1206	
[0227]	<212>DNA	
[0228]	<213>Artificial	
[0229]	<220>	
[0230]	<223>OPG 蛋白的编码序列	
[0231]	<220>	
[0232]	<221>misc_feature	
[0233]	<222>(1)..(1206)	
[0234]	<400>3	
[0235]	atgaacaagt tgetgtgctg cgcgctcgtg tttctggaca tctccattaa gtggaccacc	60
[0236]	caggaaacgt ttctccaaa gtaccttcat tatgacgaag aaacctctca teagetgttg	120
[0237]	tgtgacaaat gtctctctgg tacctaccta aaacaacact gtacagcaaa gtggaagacc	180
[0238]	gtgtgcgecc cttgccctga ccactactac acagacagct ggcacaccag tgacgagtg	240
[0239]	ctatactgea gccccgtgtg caaggagctg cagtacgtca agcaggagtg caatcgacc	300

[0240]	cacaaccgcg tgtgcgaatg caaggaaggg cgctaccttg agatagagtt ctgcttgaaa	360
[0241]	cataggagct gccctcctgg atttggagtg gtgcaagctg gaaccccaga gcgaaataca	420
[0242]	gtttgcaaaa gatgtccaga tgggttcttc tcaaatgaga cgatcatctaa agcacctgt	480
[0243]	agaaaacaca caaattgcag tgtctttggt ctctgctaa ctcaaaaagg aatgcaaca	540
[0244]	cacgacaaca tatgttccgg aacacagtga tcaactcaaa aatgtggaat agatgttacc	600
[0245]	ctgtgtgagg aggcatctt caggtttgct gttcctacaa agttttacgcc taactggctt	660
[0246]	agtgtcttgg tagacaattt gcctggcacc aaagtaaacg cagagagtgt agagaggata	720
[0247]	aaacggcaac acagctcaca agaacagact ttccagctgc tgaagttatg gaaacatcaa	780
[0248]	aacaaagccc aagatatagt caagaagatc atccaagata ttgacctctg tgaaaacagc	840
[0249]	gtgcagcggc acattggaca tgctaacctc acctcgagc agcttcgtag cttgatggaa	900
[0250]	agcttaccgg gaaagaaagt gggagcagaa gacattgaaa aaacaataaa ggcatgcaaa	960
[0251]	cccagtgacc agatcctgaa gctgctcagt ttgtggcga taaaaaatgg cgaccaagac	1020
[0252]	accttgaagg gcctaatagca cgcactaaag cactcaaaga cgtaccactt tccaaaact	1080
[0253]	gtcactcaga gtctaaagaa gaccatcagg ttcttcaca gttcacaat gtacaaattg	1140
[0254]	tatcagaagt tatttttaga aatgataggt aaccaggtcc aatcagtaaa aataagctgc	1200
[0255]	ttataa	1206
[0256]	<210>4	
[0257]	<211>1878	
[0258]	<212>DNA	
[0259]	<213>Artificial	
[0260]	<220>	
[0261]	<223>HSP 蛋白的编码序列	
[0262]	<220>	
[0263]	<221>misc_feature	
[0264]	<222>(1)..(1878)	
[0265]	<400>4	
[0266]	atggctcgtg cggtcgggat cgacctcggg accaccaact ccgtcgtctc gttcttgaa	60
[0267]	ggtggcgacc cggtcgtcgt cgccaactcc gagggctcca ggaccacccc gtcaattgtc	120
[0268]	gcgttcgccc gcaacggtga ggtgctggtc ggccagcccc ccaagaacca ggcagtgacc	180
[0269]	aacgtcgatc gcaccgtgcg ctcggtcaag cgacacatgg gcagcactg gtccatagag	240
[0270]	attgacggca agaaatacac cgcgccggag atcagcggcc gattctgat gaagctgaag	300
[0271]	cgcgacggcg aggctacct cggtagaggac attaccgacg cggttatcac gacgcccgc	360
[0272]	tacttcaatg acgccagcg tcaggccacc aaggacggcg gccagatcgc cgacctcaac	420
[0273]	gtgctgcgga tcgtcaacga gccgaccgcg gccgcgctgg cctacggcct cgacaagggc	480
[0274]	gagaaggagc agcgaatcct ggtcttcgac ttgggtgggtg gcactttcga cgtttccctg	540
[0275]	ctggagatcg gcgagggtgt ggttgaggtc cgtgccactt cgggtgacaa ccacctcgcc	600
[0276]	ggcgacgact gggaccagcg ggtcgtcgat tggctgggtg acaagttcaa gggcaccagc	660
[0277]	ggcatcgatc tgaccaagga caagatggcg atgcagcggc tgcgggaagc cgccgagaag	720
[0278]	gcaaagatcg agctgagttc gagtcagtcc acctcgatca acctgcccta cateaccgtc	780

[0279]	gacgccgaca agaaccggtt gttcttagac gagcagctga cccgcgcgga gttccaacgg	840
[0280]	atcactcagg acctgctgga ccgcactcgc aagccgttcc agtcggtgat cgctgacacc	900
[0281]	ggcatttcgg tgtcggagat cgatcacggt gtgctcgtgg gtggttcgac ccggatgccc	960
[0282]	gcggtgaccg atctggtcaa ggaactcacc ggcggcaagg aaccaacaa gggcgtcaac	1020
[0283]	cccgatgagg ttgtcgcggt gggagccgct ctgcaggccg gcgtcctcaa gggcgaggtg	1080
[0284]	aaagacgttc tgctgcttga tgttaccccg ctgagcctgg gtatcgagac caagggcggg	1140
[0285]	gtgatgacca ggctcatcga gcgcaacacc acgatcccca ccaagcggtc ggagactttc	1200
[0286]	accaccgccg acgacaacca accgtcggtg cagatccagg tctatcaggg ggagcgtgag	1260
[0287]	atcgccgcgc acaacaagtt gctcgggtcc ttcgagctga ccggcatccc gccggcgcg	1320
[0288]	cgggggattc cgagatcga ggctactttc gacatcgacg ccaacggcat tgtgcacgtc	1380
[0289]	accgccaagg acaagggcac cggcaaggag aacacgatcc gaatccagga aggctcgggc	1440
[0290]	ctgtccaagg aagacattga ccgatgatc aaggacccg aagcgcacgc cgaggaggat	1500
[0291]	cgcaagcgtc gcgaggagc cgatgttcgt aatcaagccg agacattggt ctaccagacg	1560
[0292]	gagaagttcg tcaaagaaca gcgtgaggcc gagggtggtt cgaaggtacc tgaagacacg	1620
[0293]	ctgaacaagg ttgatccgc ggtggcggaa gcgaaggcgg cacttggcgg atcggatatt	1680
[0294]	tcgccatca agtcggcgat ggagaagctg ggccaggagt cgcaggctct ggggcaagcg	1740
[0295]	atctacgaag cagctcaggc tgcgtcacag gccactggcg ctgcccaccc cggcggcgag	1800
[0296]	ccgggcggtg cccaccccg ctcggctgat gacgttggtg acgcggagggt ggtcgacgac	1860
[0297]	ggccgggagg ccaagtga	1878
[0298]	<210>5	
[0299]	<211>23	
[0300]	<212>DNA	
[0301]	<213>Artificial	
[0302]	<220>	
[0303]	<223> 引物	
[0304]	<220>	
[0305]	<221>misc_feature	
[0306]	<222>(1)..(23)	
[0307]	<400>5	
[0308]	atgaacaagt tgctgtgctg cgc	23
[0309]	<210>6	
[0310]	<211>23	
[0311]	<212>DNA	
[0312]	<213>Artificial	
[0313]	<220>	
[0314]	<223> 引物	
[0315]	<220>	
[0316]	<221>misc_feature	
[0317]	<222>(1)..(23)	

[0318]	<400>6	
[0319]	ttataagcag cttatTTTTta ctg	23
[0320]	<210>7	
[0321]	<211>27	
[0322]	<212>DNA	
[0323]	<213>Artificial	
[0324]	<220>	
[0325]	<223> 引物	
[0326]	<220>	
[0327]	<221>misc_feature	
[0328]	<222>(1)..(27)	
[0329]	<400>7	
[0330]	catgcatgg aaacgtttcc tccaaag	27
[0331]	<210>8	
[0332]	<211>61	
[0333]	<212>DNA	
[0334]	<213>Artificial	
[0335]	<220>	
[0336]	<223> 引物	
[0337]	<220>	
[0338]	<221>misc_feature	
[0339]	<222>(1)..(61)	
[0340]	<400>8	
[0341]	cgtcgtgata accgcgtcgg taatgccgcc gccgccgccg ctttttgag ttgattcact	60
[0342]	g	61
[0343]	<210>9	
[0344]	<211>51	
[0345]	<212>DNA	
[0346]	<213>Artificial	
[0347]	<220>	
[0348]	<223> 引物	
[0349]	<220>	
[0350]	<221>misc_feature	
[0351]	<222>(1)..(51)	
[0352]	<400>9	
[0353]	ccgctcgagt caggcgtcat tgaagtaggc gggcgtcgtg ataaccgct c	51

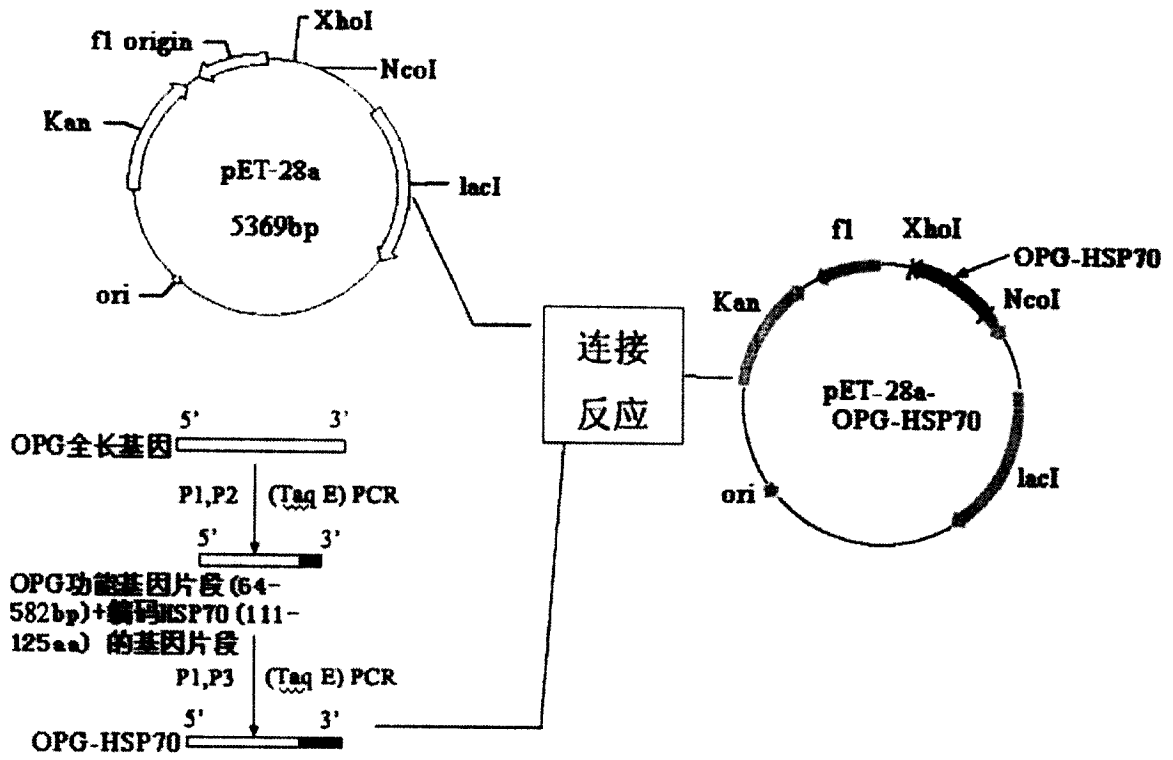


图 1

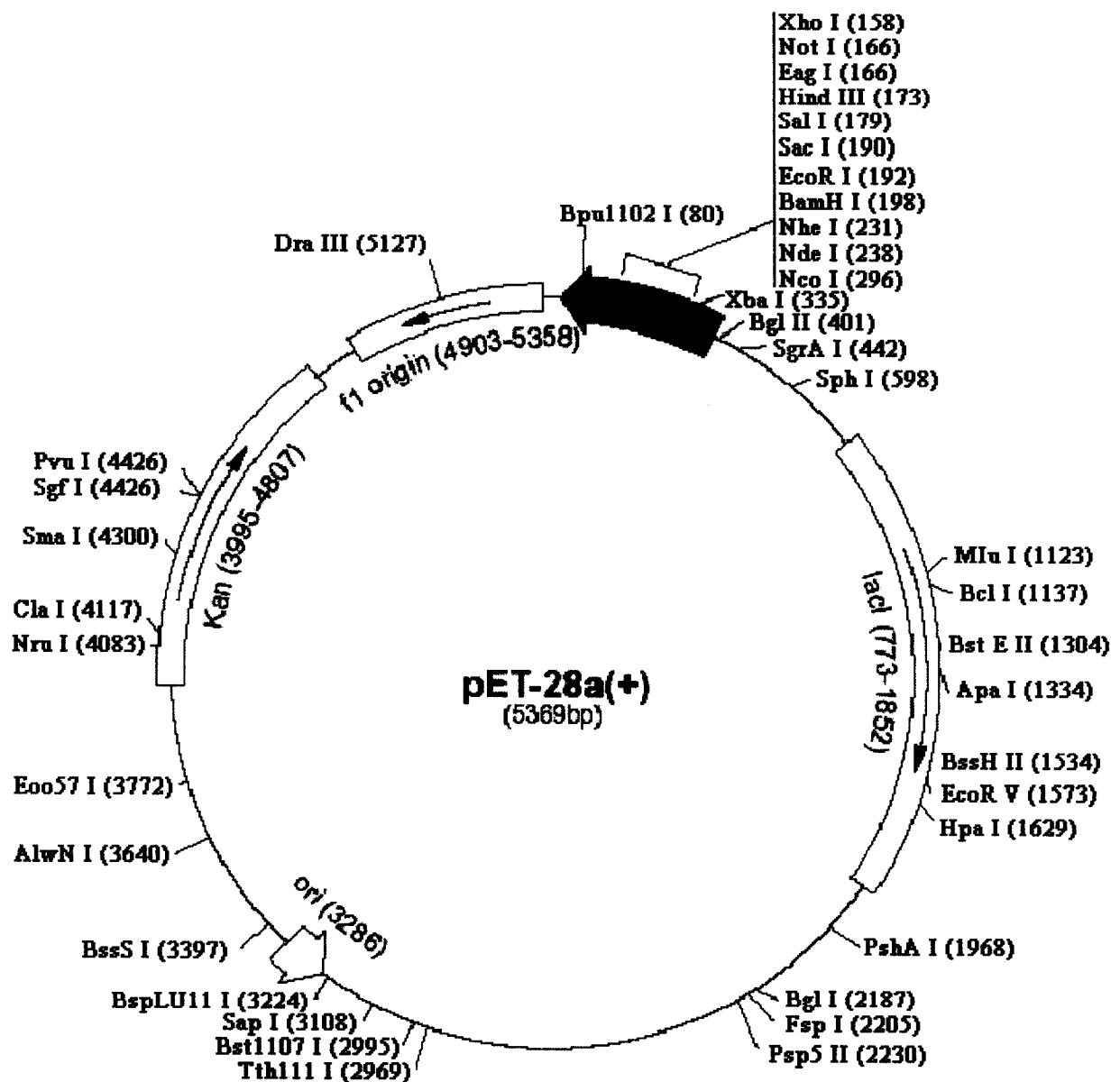


图 2

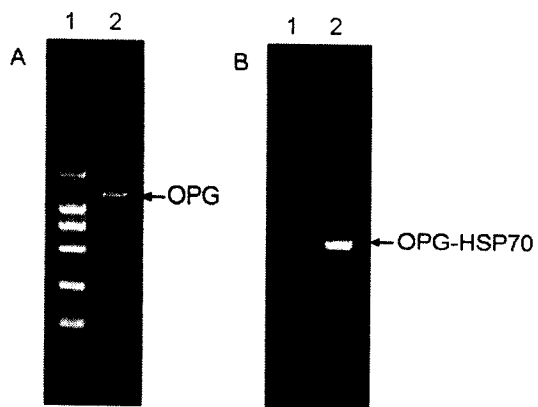


图 3

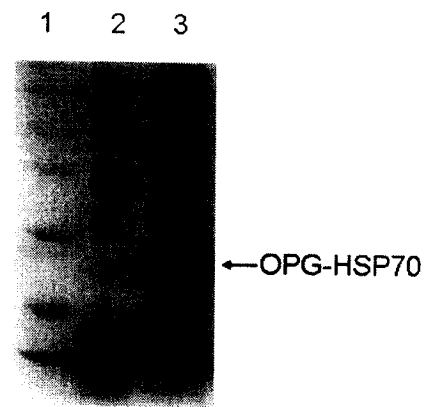


图 4

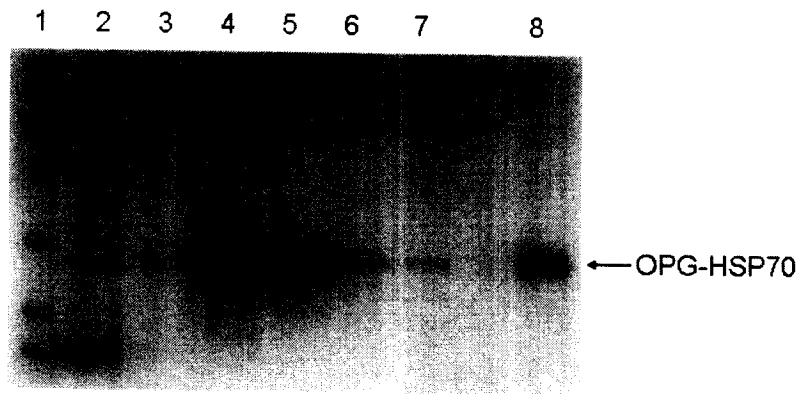


图 5

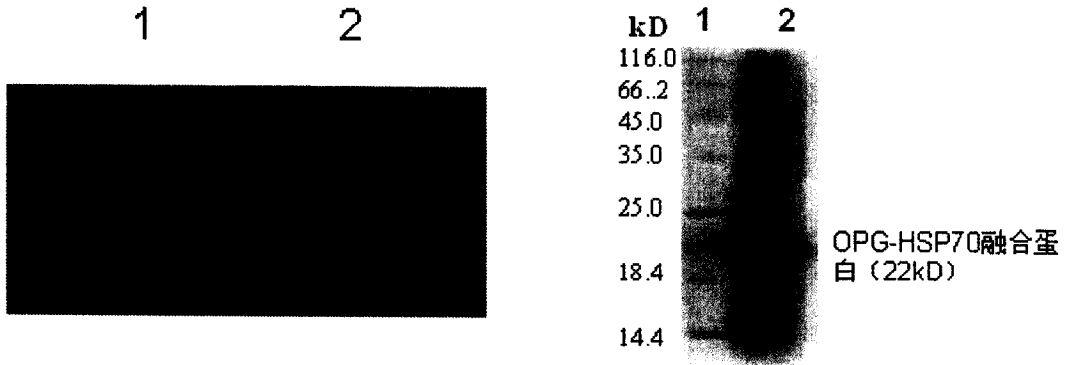


图 6

图 7

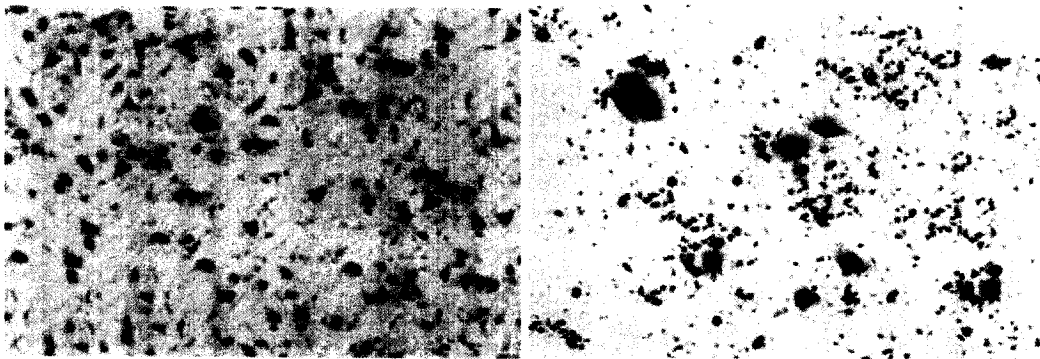


图 8

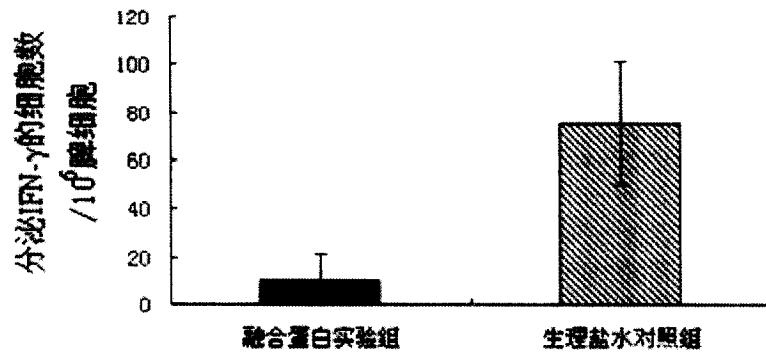


图 9

组别	例数	左右耳厚度之差 ($\bar{x} \pm s$)
实验组	4	0.098±0.039
对照组	4	0.195±0.060

图 10 注:单因素方差分析, $F = 7.070$, $P < 0.05$